

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-14388

(P2000-14388A)

(43) 公開日 平成12年1月18日 (2000.1.18)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/47		C 0 7 K 14/47	4 B 0 6 4
C 1 2 P 21/02		C 1 2 P 21/02	C 4 H 0 4 5
// (C 1 2 P 21/02			
C 1 2 R 1:865)			

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平10-202894

(22) 出願日 平成10年7月3日 (1998.7.3)

(71) 出願人 000103840

オリエンタル酵母工業株式会社

東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号

(72) 発明者 小笠原 雄次

東京都板橋区小豆沢三丁目6番10号 オリ  
エンタル酵母工業株式会社内

(72) 発明者 内田 浩二

東京都板橋区小豆沢三丁目6番10号 オリ  
エンタル酵母工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組換えCRPおよびその製造方法

(57) 【要約】

【構成】 ヒト染色体のCRP (C反応性タンパク質) 遺伝子をPCR法で増幅し、ベクタープラスミドに連結した組換え体プラスミドおよび該組換え体プラスミドで形質転換された酵母を作製すると同時に、有用物質のCRPを、十分に活性を保持した状態で安定に大量に製造する。

【効果】 ヒトCRPを大量生産することが可能となった。

#### 【特許請求の範囲】

【請求項1】生物学的に活性な組換えC反応性タンパク質の製造方法であって、

- a) C反応性タンパク質をコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み；
- b) 前記発現ベクターで宿主細胞を形質転換し；そして
- c) 形質転換した宿主細胞を培養することを特徴とする前記製造方法。

【請求項2】発現ベクターが、酵母発現ベクターYRp 1 Gである請求項1に記載の方法。

【請求項3】宿主細胞が、酵母である請求項1ないし2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項4】請求項1ないし3のいずれか1項に記載の方法により製造された、組換えC反応性タンパク質。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、C反応性タンパク質（以下、「CRP」という）の組換えタンパク質、およびその製造方法に関する。本発明は、特に、ヒトCRP遺伝子を有する新規なプラスミド、このプラスミドで形質転換された新規な微生物、例えば酵母および該形質転換体を培養することによるヒトCRPの新規製造方法に関するものである。

【0002】本発明によってCRPの工業的製法が確立され、しかも特にヒトCRPは純度が非常に高いので、医薬はもとより診断、臨床検査の技術分野においても、有利に利用することができる。

##### 【0003】

【従来の技術】CRPは、肺炎球菌の莢膜のC多糖体と反応する血清中の $\beta$ グロブリン分画に存在するタンパク質であり、感染、炎症、組織損傷などによって血中濃度が0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ から数百倍から千倍に激増する急性期タンパク質の一種として知られている。CRPは分子量が13万で同一ペプチド5個からなり、そのアミノ酸配列は血清アミロイドのPタンパク質、補体C1の一部と相同性がある。CRPとC多糖体との複合体は補体の古典的経路を活性化することが知られている。（生化学辞典 第2版 第615頁 1990年発行 株式会社東京化学同人）。また、ヒトのマクロファージを用いた *in vitro* の実験でCRPがIL-1を介してマクロファージのIL-6産生促進作用を持つことが知られている。よって、CRPは生体内における免疫系において何らかの重要な機能を果たしていると推測されるものの、生体内における実際の機能は未だに不明な点が多いタンパク質である。

【0004】臨床検査分野において、血中CRP濃度の定量は、一元免疫拡散法、毛細管法などCRPを含む被検血清に抗CRP血清を加える方法で測定されている。しかし、現在用いられている腹水由来の抗原はCRPとアミノ酸配列上のホモロジーの高いSAP (Serum

Amyloid P Component)をはじめとする血清成分を、抗原として問題のない程度まで精製除去したものであるが、そのためには多くの精製ステップが必要となり生産コストがかかる。また精製が不十分で血清成分が混合したようなCRPを抗原として動物に免疫して得られた抗血清あるいはIgGを用いて血液中のCRPを測定すると、精製で完全に除去できなかったSAPをはじめとする血清成分に対する抗体のバックグラウンドがあって正確に定量することが難しかった。

【0005】それゆえ、臨床検査分野における抗原CRPとしてSAPをはじめとする血清成分の残存の無い高純度で安価なCRPの出現が熱望されていた。

【0006】一方、組換えDNAに有用なプラスミドおよびそれによって形質転換された微生物はよく知られている。例えば、Science, 198, 1056 (1978) には、プラスミドpBR322にラクトースプロモーターをつないだプラスミドを導入した大腸菌内で動物タンパク質が生産されることが記載されている。

【0007】また、近年の遺伝子工学技術により、ヒトCRPをコードする遺伝子も開示されている。例えば、LeiraのJ. Biol. Chem. 260, 13377 (1985) および、WooらのJ. Biol. Chem. 260, 13384 (1985) により開示されている。本報告は、ヒトCRP遺伝子配列を染色体からと、cDNA (メッセンジャーRNAから逆転写酵素でDNAに転写した遺伝子) から決定している。大腸菌などにおいて組換えタンパク質を発現させることも実際に行われている (田中俊夫、松尾雄志：臨床化学, 23 (supl, 2) : 107b, 1994)。

【0008】しかし、記載のプラスミドは大腸菌で形質転換される全塩基配列を含むものであり、全CRP遺伝子をベクタープラスミドに結合し、大腸菌以外の微生物を宿主細胞とした形質転換体を培養して該タンパクを作ることを教示していない。

##### 【0009】

【発明が解決しようとする課題】臨床検査分野において、血液中のCRP量を定量する場合、その抗体作製に用いる抗原CRPに微量の血清成分 (特にSAP) が残存すると、得られた抗血清は残存血清成分に対する抗体も含むことになり、測定値にバックグラウンドが生じる。従ってヒトの原料から抗原CRPを調製する限り、血液中のCRP量を正確に定量できるCRP抗体の調製が困難であった。

##### 【0010】

【課題を解決するための手段】そこで、上記問題を解決するために鋭意研究を行った結果、遺伝子工学的にCRPを調製することによって、生物学的に活性な組換えCRPを大量に製造することを可能とした。具体的には、本発明の製造方法は、ヒトCRP遺伝子を用いた遺伝子工学技術により、ヒトCRPを製造することを特徴とす

る。また、上記本発明の製造方法により製造された、組換えヒトCRPを提供する。

【0011】本発明者らは、CRPをヒトプラセンタ由来の染色体DNAからPCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いて増幅し、これを発現できるプラスミドにクローン化し、および該プラスミドで形質転換された酵母が大量のヒトCRPを生産すること、またこの組換えCRPは天然型と全く同一のアミノ酸配列を持ち、天然型と同様にカルシウムイオン存在下にホスホリルコリンと結合すること、ホスホリルコリン固定化カラムを用いたアフィニティ精製法を用いることで抗原として最適な純度にまで精製されることを見出したのである。

【0012】そして更に検討を行い、このようにして得られた組換えCRPを抗原として免疫し、血清成分と交差しないCRP抗体が得られることを確認し、遂に本発明の完成に至ったものである。

【0013】本発明は、ヒト染色体のCRP遺伝子をPCR法で増幅し、ベクタープラスミドに連結した組換え体プラスミドおよび該組換え体プラスミドで形質転換された酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を作製すると同時に、有用物質のCRPを、十分に活性を保持した状態で安定に大量に製造し、市場に供給することを要旨とする。

【0014】本発明のプラスミドを得るには、例えば *Biochim. Biophys. Acta.*, 72, 619-629 (1963) の記載の方法に従い、CRP遺伝子とプロモーター及びベクターとしての役割を有するDNAとを *J. Mol. Biol.* 96, 171-184 (1974) に記載の方法で制限酵素で消化し、次いでリガーゼを用いて連結することにより調製できる。本発明は、その一態様において、発現ベクターが、配列番号2に示す酵母発現ベクターYRp1Gである。

#### 【0015】CRP遺伝子

CRPは天然に由来するものでも、遺伝子工学技術によって発現された組換えタンパク質に由来するものでもよいが、病原性の二次感染を考慮すると組換え型が有利である。天然のCRPは、例えばINCSTAR社(米国)から入手可能である。また、CRPについてはその遺伝子の全塩基配列が解明されており(Wo P, Kornberg JR, Whitehead AS, *J. Biol. Chem.*, 260:13384-13388, 1985)、また、ヒト以外にも多くの哺乳類に存在していると考えられ、そのような他の哺乳類に存在するタンパク質も本発明の方法に使用できる。CRP遺伝子は、前記先行技術文献等に基づいて慣用された技術、例えば、ハイブリダイゼーション法、PCR法等によって得ることができる。

【0016】さらに、本明細書においてCRP遺伝子は限定されるわけではないが、例えば配列番号1に記載さ

れた206アミノ酸残基のアミノ酸配列をコードする塩基配列を意味する。

【0017】天然のアミノ酸配列と異なっている、上記CRPの生物活性を有する類似体は、本発明の組換えに含まれる。類似体は、例えば、保存的に置換された配列を含むことができ、天然のCRPの1個またはそれ以上のアミノ酸残基は、異なった残基で置き換えられるが、その保存置換されたCRPは、天然のタンパク質の場合と本質的に同等の望まれる生物学的活性を保持していることが示される。保存置換の例としては、CRPの二次および/または三次構造を変化させないアミノ酸の置換がある。当業者は、上述したような公知の遺伝子工学技術を用いて、例えば、ヒトCRP遺伝子を容易に1またはそれ以上の塩基配列の欠失、置換または付加を行い、ヒトCRPの類似体を得ることができる。また、天然に存在するヒトCRPの類似体、例えばアシルも、本発明のヒトCRPに含まれる。さらにまた、グリコシル基、脂質、リン酸塩、アセチル基等のような他の化学残基との共有結合または凝集結合を形成することによって、ヒトCRPの誘導体を生成するように修飾することもできる。

#### 【0018】発現ベクターおよび宿主細胞

本発明は、組換えヒトCRP発現のための組換え発現ベクター、および該発現ベクターで形質転換された宿主細胞を提供する。いずれかの適当な発現系を用いることもできる。酵母の発現系が好ましい。発現ベクターは、酵母等の微生物、哺乳動物、ウイルスまたは昆虫遺伝子にするものなどの適当な転写または翻訳調節ヌクレオチド配列に対して機能的に結合した、ヒトCRPをコードする遺伝子を含む。調節配列の例としては、転写プロモーター、オペレーターまたはエンハンサー、mRNAのリボソーム結合部位、並びに転写および翻訳の開始および終結を制御する適当な配列が含まれる。ヒトCRPの大量発現を可能にするために、強力な転写プロモーター配列を発現ベクターに含ませることが好ましい。また、一般に、所望の宿主細胞中で複製する能力を与える複製起点、および形質転換細胞を識別する選択遺伝子を、発現ベクター中に包含させる。

【0019】本発明の発現ベクターを得るには、例えば *Biochem. Biophys. Acta*, 72, 619-629, 1963に記載の方法に従い、ヒトCRP遺伝子とプロモーター及びベクターとしての役割を有するDNAとを *J. Mol. Biol.*, 96, 171-184, 1974に記載の方法で、例えばEcoRI, BamHI等の制限酵素で消化し、次いで、例えばT4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて結合することにより調製できる。

【0020】ヒトCRPの発現に適当な宿主細胞としては、酵母、原核細胞または高等真核生物細胞がある。酵母、細菌、真菌および哺乳動物細胞宿主と一緒に用いる

のに適当なクローニングおよび発現ベクターは、例えば、Pouwelsら、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, エルゼビア、ニューヨーク (1985) に記載されている。

【0021】ヒトCRPは、好ましくは、酵母宿主中で、特に好ましくは、サッカロマイセス属 (例えば、サッカロマイセス・セレビシエ) 中で発現させることができる。ピキア属 (*Pichia*) 属またはクルイペロミセス属 (*Kluyveromyces*) などの酵母の他の属を用いてもよい。酵母ベクターは、2  $\mu$  酵母プラスミドからの複製起点配列、自己複製配列 (ARS)、プロモーター領域、ポリアデニル化のための配列、転写終結のための配列および選択可能マーカー遺伝子などを用いることもできる。

【0022】酵母ベクターに適当なプロモーター配列には、特に、メタロチオネイン、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) (Hitzemanら、J. Biol. Chem. 255:2073, 1980)、またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼなどの他の解糖酵素 (Hessら、J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; およびHollanderら、Biochem. 17:4900, 1978) のプロモーターが含まれる。酵母発現で用いるための他の適当なベクターおよびプロモーターは、Hitzeman, EPA-73, 657号で更に記載されている。また、グルコース抑制性のADH1 (Bennetzenら、J. Biol. Chem. 257:3018, 1982) 又はADH2 (Russellら、J. Biol. Chem. 258:2674, 1982; およびBeierら、Nature 300:724, 1982) を用いることもできる。あるいは、GAL1、GAL10 (St. Johnら、Cell 16:443, 1979; およびSt. Johnら、J. Mol. Biol. 152:285, 1981) 等を用いることもできる。さらに、酵母および大腸菌の両方で複製可能なシャトルベクターを、大腸菌中での選択および複製のためのpBR322 (ATCC37017) からのDNA配列 (Amp耐性遺伝子および複製起点) を上記酵母ベクター中に挿入することによって構築することもできる。分泌シグナルとしては、インペルターゼ、酸性フォスファターゼ、性フェロモン ( $\alpha$  因子、a 因子)、キラー毒素などが挙げられる。

【0023】酵母宿主細胞での発現ベクターとしては、例えば、配列番号2に示す、酵母のYEp1G (特開平7-289267号公報) が好ましい。酵母宿主細胞の

代わりに、グラム陰性またはグラム陽性の微生物等の原核生物、例えば、大腸菌またはバチルス属 (*Bacilli*) を宿主細胞として用いることができる。形質転換に適当な原核生物宿主細胞には、例えば、大腸菌、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、並びにシュドモナス属 (*Pseudomonas*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*) 及びブドウ球菌属 (*Staphylococcus*) 内の様々な他の種が含まれる。

【0024】原核生物宿主細胞中で用いるための発現ベクターは、概して、1種類またはそれ以上の表現型選択可能マーカー遺伝子を含む。表現型選択可能マーカー遺伝子は、例えば、抗生物質耐性を与えるかまたは独立栄養要求を与えるタンパク質をコードしている遺伝子である。原核生物宿主細胞に有用な発現ベクターの例としては、クローニングベクターpBR322 (ATCC37017) などの商業的に入手可能なプラスミドにするものがある。他の商業的に入手可能なベクターとしては、例えば、pKK233-3 (Pharmacia Fine Chemicals, ウプサラ、スウェーデン) およびpGEM1 (Promega Biotec, マディソン、WI、米国) がある。

【0025】組換え原核生物宿主細胞発現ベクターに一般的に用いられるプロモーター配列としては、 $\beta$ -ラクターゼ (ベニシリナーゼ)、ラクトースプロモーター系 (Changら、Nature 275:615, 1978; およびGoeddelら、Nature 281:544, 1979)、トリプトファン (trp) プロモーター系 (Goeddelら、Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; およびEPA-36776号)、T7プロモーター系 (Davanlooら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2035, 1984) およびtacプロモーター (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 412頁, 1982) がある。また、ファージ $\lambda$  P LプロモーターおよびcI857ts熱不安定性リプレッサー配列を用いることもできる。また、分泌シグナルペプチドとしては例えば大腸菌のアルカリ性ホスファターゼ、外膜タンパク質A、外膜タンパク質F、 $\beta$ -ラクターゼなどのシグナルペプチドがあげられる。制限酵素としては、例えばEcoRI、PstIがあげられ、リガーゼとしては、例えばT4DNAリガーゼがあげられる。

【0026】あるいは、哺乳動物または昆虫宿主細胞培養系もまた、組換えCRPを発現させるのに用いることができる。哺乳動物宿主細胞中で用いるための発現ベクターは、例えば、オカヤマおよびパーグ (Mol. Ce

11 Biol. 3:280, 1983) によって開示されたように構築することができる。

【0027】上述したように、本発明においては広範な範囲から選択された宿主細胞を用いることができる。当業者は本明細書の記載に基づいて、適当な宿主細胞を選択することが可能である。好ましい宿主細胞は、公知の遺伝子工学技術、交配技術等によって得ることもできる。あるいは、天然に得られた突然変異体から、好ましい宿主細胞を選択することもできる。

#### 【0028】ヒトCRPの発現

上記発現ベクターを用いて、選択された所期の宿主細胞を公知技術を用いて形質転換することができる。例えば、酵母の形質転換プロトコルは、Hinnenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929, 1978に記載されている。形質転換された宿主細胞は、各宿主細胞に応じ、組換えヒトCRPの発現に適した条件下で培養される。

【0029】本発明の方法によって製造されたCRPタンパク質は、公知の方法によって精製することができる。製造されたCRPタンパク質は、宿主細胞を溶菌しその他の微生物性タンパク質から適当に精製して、あるいは、ある場合には、CRPタンパク質を分泌している培養液から精製して回収することができる。例えば、組換えCRPタンパク質が培養液中に分泌される場合は、先ず、商業的に入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過装置を用いてその培地を濃縮することができる。濃縮工程後、その濃縮物をゲル濾過基剤などの精製マトリックスに対して適用することができる。或いは、陰イオン交換樹脂、例えば、ジエチルアミノエチル (DEAE) 側基を有するマトリックスまたは支持体を用いることができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製において一般的に用いられる他の種類であり得る。或いは、陽イオン交換樹脂を用いることができる。適当な陽イオン交換体としては、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスがある。最後にCRPタンパク質を更に精製するために、1回またはそれ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) 工程を、疎水性RP-HPLC基剤 (例えば、遊離のメチルまたは他の脂肪族側基を有するシリカゲル) を用いて、使用することができる。前述の精製工程のいくつかまたは全てを様々な組み合わせを用いて、精製ヒトCRPタンパク質を提供することができる。酵母宿主細胞からの分泌組換えタンパク質は、例えば、Urdalら (J. Chromatog. 296: 171, 1984) によって開示されたものと同様の方法によって精製することができる。CRPタンパク質が培養物、分離菌体、分離菌体の処理物、粗蛋白抽出液、粗製蛋白などのあらゆる段階で採取可能とな

る。その際の精製法としては、通常の蛋白精製法を用いることができる。

【0031】ヒトCRPタンパク質は、例えば、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって他のタンパク質に相当するタンパク質バンドが検出できないように精製される。タンパク質バンドは、銀染色、クマシーブルー染色 (タンパク質が放射標識されている場合) オートラジオグラフィによって目視することができる。

【0032】本発明に用いられるヒトCRP遺伝子としては、ヒトプラセンタの染色体DNAを鋳型としてPCR法で増幅することができる。この時用いる増幅用のプライマーとしては、ヒトCRP遺伝子の塩基配列に基づいて設計した塩基配列である。これを活性の強いプロモーターに接続し、YEp型などの多コピー型のベクターを用いて、宿主細胞に導入し、形質転換した。

【0033】当該微生物を培養するに際して用いられる栄養培地の炭素源として、例えばグルコース、シュクロース、フルクトース、澱粉加水分解物、糖蜜、亜硫酸パルプ廃液の糖類、酢酸、乳酸などの有機酸類、さらには使用する細菌が資化するアルコール類、脂肪酸及びグリセリンなどが使用でき、窒素源として、例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、磷酸アンモニウム、アミノ酸、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどの無機または有機物が使用できる。さらに無機塩類として、例えばカリウム、ナトリウム、磷酸、亜鉛、鉄、マグネシウム、マンガン、銅、カルシウム、コバルトなどの各塩類、必要に応じて微量金属塩、コーン・ステープ・リカー、ビタミン類、核酸などを使用してもよく、細菌の一般的な培地が使用できる。

【0034】これらの培地を用いて、本発明の酵母を20~45℃、好ましくは25~35℃、最適には30℃、pHを7.0~7.4、最適には7.2で好氣的に培養すればよい。

【0035】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これらは、本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

#### 【0036】

##### 【実施例】

#### 【0037】実施例1 組換えCRP発現のための発現ベクターの作製

ヒトプラセンタの染色体DNA [クローンテック (CLONTECH) 社製] を鋳型として、次の一本鎖合成オリゴヌクレオチドである2種のプライマーの組み合わせを用いて、「遺伝子工学製品ガイド」(宝酒造株式会社、1995-1996) の記載に従って、ヒトCRP遺伝子をPCR法により増幅した。

【0038】5'-GCTGCAGTCAGGGCCA

CAGCTGGGTTT-3'

5'-GGAATTCATGCAGACAGACATG  
TCGAGGAAGGCTTTTGTGTTTCCCA  
AA-3'

【0039】この反応液のフェノール抽出によって夾雑蛋白質の除去を行った。さらにアガロース電気泳動で約0.64kbのヒトCRP遺伝子の増幅が確認できた。

【0040】当該CRP遺伝子と終止コドンを含むを含むEcoRI-PstI切断部位間を、市販の大腸菌ベクターpUC18のEcoRI-PstIの切断部位に挿入して、pUC CRPを構築した。

【0041】酵母内発現用の多コピー型ベクターとして、配列番号1に示す塩基配列を有するYRp1G（特開平7-289267号）を利用した。YRp1G、高いプロモーター活性を有するGAP（グリセルアルデヒド3リン酸デヒドロゲナーゼ）プロモーターを含む。pUC CRPのCRP構造遺伝子を含む切断部位間をパン酵母発現ベクター、YRp1Gへ挿入して、発現プラスミドYRp1G CRPを作成した。（図1）

#### 【0042】実施例2 組換えCRPの生産

前述の特開平7-289267号に記載された方法に従い、組換えCRPタンパクの産生を行った。まず、実施例1で作成した発現ベクターYRp1G CRPを用いてパン酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）を形質転換した。該形質転換酵母宿主細胞を、特開平7-289267号に記載された方法に従い、16L容量発酵槽において組換えCRPの生産を行

ウサギ抗組換えヒトCRP抗血清と抗天然型ヒトCRP抗血清のベッカータイ  
ター値の比較

抗血清	ベッカータイター (mg/ml)	
	天然型CRP	組換えCRP
N1	4.5	4.6
N2	5.0	4.9
R2	6.8	6.9
R4	6.5	6.6
R8	4.7	4.6

【0047】これらの抗体をCRP標準血清CA-7（ATAB社製）、正常ヒト血清CA-1（ATAB社製）、CRP（-）血清、SAPを用いてウエスタンブロッティングで分析すると両者は全く同一の反応性を示した。

#### 【0048】

【発明の効果】以上述べたように、本発明によればCRPタンパク質をコードする遺伝子を発現ベクターに組込んだものを使用して宿主細胞を形質転換し、当該宿主細胞によって前述の遺伝子を発現させることにより、CRPタンパク質を大量に供給することが可能となった。

った。その結果、510gの湿菌体が得られた。その菌体を等量の5mM βメルカプトエタノールと1mM EDTAを含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液に懸濁し、菌体をダイノミルで破碎し、細胞片を遠心分離によって除去することにより無細胞溶解物の粗抽出液を調製した。

【0043】組換えCRPの精製は、ホスホコリンをBSAを介してトヨパールに固定化したカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーで精製した。精製した組換えCRPをSDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したところ、天然型CRPと同一分子量の位置に泳動された。さらに組換えCRPを電気泳動したアクリルアミドゲルを電気的にPVDF膜に転写し、天然型CRPをウサギに免疫して得られた抗体を用いたウエスタンブロッティング法で染色したところ、天然型CRPと同一の位置に染色された。

【0044】ついで、組換えCRPをプロテインシーケンサーを用いてN末端から10残基シーケンスしたところ、天然型の配列と一致した。

#### 【0045】実施例3 抗体性能測定

実施例2で調製した精製した組換えCRPをフロイントの完全アジュバントと共にウサギに免疫して得られた抗血清をヒト腹水から精製したCRPを、ウサギに免疫して得られた抗血清と比較すると、同等のベッカータイター値を示した。（下記する表1）

#### 【0046】

##### 【表1】

ウサギ抗組換えヒトCRP抗血清と抗天然型ヒトCRP抗血清のベッカータイ

ター値の比較

【0049】また、得られた組換え型CRPは天然型とまったく同じアミノ酸配列を持ち、これを精製後免疫してえられた抗血清は天然型を免疫してえられた抗血清とまったく同じ反応性を示すため、臨床検査用の試薬として血液中のCRP量を正確に定量するための抗体を調製するための抗原、あるいはキャリブレーターとして非常に有用である。

#### 【0050】

##### 【配列番号】

##### 【0051】

配列番号: 1

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 5848塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: cDNA

(iii) ハイボセティカル: NO

(iv) アンチセンス: NO

(vii) 直接の起源:

(A) 生物名: ヒト

(xi) 配列: 配列番号: 1

配列:

```
CAG ACA GAC ATG TCG AGG AAG GCT TTT GTG TTT CCC AAA GAG TCG 45
Gln Thr Asp Met Ser Arg Lys Ala Phe Val Phe Pro Lys Glu Ser
      5              10              15
GAT ACT TCC TAT GTA TCC CTC AAA GCA CCG TTA ACG AAG CCT CTC 90
Asp Thr Ser Tyr Val Ser Leu Lys Ala Pro Leu Thr Lys Pro Leu
      20              25              30
AAA GCC TTC ACT GTG TGC CTC CAC TTC TAC ACG GAA CTG TCC TCG 135
Lys Ala Phe Thr Val Cys Leu His Phe Tyr Thr Glu Leu Ser Ser
      35              40              45
ACC CGT GGG TAC AGT ATT TTC TCG TAT GCC ACC AAG AGA CAA GAC 180
Thr Arg Gly Tyr Ser Ile Phe Ser Tyr Ala Thr Lys Arg Gln Asp
      50              55              60
AAT GAG ATT CTC ATA TTT TGG TCT AAG GAT ATA GGA TAC AGT TTT 225
Asn Glu Ile Leu Ile Phe Trp Ser Lys Asp Ile Gly Tyr Ser Phe
      65              70              75
ACA GTG GGT GGG TCT GAA ATA TTA TTC GAG GTT CCT GAA GTC ACA 270
Thr Val Gly Gly Ser Glu Ile Leu Phe Glu Val Pro Glu Val Thr
      80              85              90
GTA GCT CCA GTA CAC ATT TGT ACA AGC TGG GAG TCC GCC TCA GGG 315
Val Ala Pro Val His Ile Cys Thr Ser Trp Glu Ser Ala Ser Gly
      95              100             105
ATC GTG GAG TTC TGG GTA GAT GGG AAG CCC AGG GTG AGG AAG ACT 360
Ile Val Glu Phe Trp Val Asp Gly Lys Pro Arg Val Arg Lys Ser
      110             115             120
CTG AAG AAG GGA TAC ACT GTG GGG GCA GAA GCA AGC ATC ATC TTG 405
Leu Lys Lys Gly Tyr Thr Val Gly Ala Glu Ala Ser Ile Ile Leu
      125             130             135
GGG CAG GAG CAG GAT TCC TTC GGT GGG AAC TTT GAA GGA AGC CAG 450
Gly Gln Glu Gln Asp Ser Phe Gly Gly Asn Phe Glu Gly Ser Gln
      140             145             150
TCC CTG GTG GGA GAC ATT GGA AAT GTG AAC ATG TGG GAC TTT GTG 495
Ser Leu Val Gly Asp Ile Gly Asn Val Asn Met Trp Asp Phe Val
      155             160             165
CTG TCA CCA GAT GAG ATT AAC ACC ATC TAT CTT GGC GGG CCC TTC 540
Leu Ser Pro Asp Glu Ile Asn Thr Ile Tyr Leu Gly Gly Pro Phe
      170             175             180
AGT CCT AAT GTC CTG AAC TGG CGG GCA CTG AAG TAT GAA GTG CAA 585
```

Ser Pro Asn Val Leu Asn Trp Arg Ala Leu Lys Tyr Glu Val Gln  
 185 190 195  
 GGC GAA GTG TTC ACC AAA CCC CAG CTG TGG CCC TGA 621  
 Gly Glu Val Phe Thr Lys Pro Gln Leu Trp Pro \*\*\*  
 200 205 206

【0052】

配列番号：2

(i) 配列の特性

(A) 長さ：5848塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：二本鎖

(D) トポロジー：両形態

(ii) 配列の種類：cDNA

(iii) ハイボセティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vii) 直接の起源：

(C) クローン名：YRp1G

(xi) 配列：配列番号：2

配列：

1 AGATCTGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAATGGTTTC  
 61 TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT  
 121 CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCTTGATAAA TGCTTCAATA  
 181 ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT  
 241 ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT  
 301 TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA GCGGTAAGAT  
 361 CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAACGTTT TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTCTGCT  
 421 ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA  
 481 CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG  
 541 CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA  
 601 CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC GCTTTTTTGC ACAACATGGG  
 661 GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA  
 721 CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAAGTGG  
 781 CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT  
 841 TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG  
 901 AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC  
 961 CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA  
 1021 GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC  
 1081 ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT  
 1141 CCTTTTGTAT AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC  
 1201 AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTCTGC GCGTAATCTG  
 1261 CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT  
 1321 ACCAACTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT  
 1381 TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT  
 1440 CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG  
 1501 GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGTTTC  
 1561 GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA  
 1621 GCTATGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CCGTAAGCGG  
 1681 CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAACGCCT GGTATCTTTA  
 1741 TAGTCTGTGC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG  
 1801 GGGCGGAGC CTATGAAAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG



1861 CTGGCCTTTT GTCACATGT TCTTCTCTGC GTTATCCCCT GATTCTGTGG ATAACCGTAT  
1921 TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC  
1981 AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCGG CGCGTTGGCC  
2041 GATTCATTAA TGCAGCTGGC ACGACAGGTT TCCGACTGG AAAGCGGGCA GTGAGCGCAA  
2101 CGCAATTAAT GTGAGTTAGC TACTCATTG GGCACCCAG GCTTTACTT TTATGCTTCC  
2161 GGCTCGTATG TTGTGTGGAA TTGTGAGCGG ATAACAATTT CACACAGGAA ACAGCTATGA  
2221 CCATGATTAC GCCAAGCTTA CATTTTATGT TAGCTGGTGG ACTGACGCCA GAAAATGTTG  
2281 GTGATGCGCT TAGATTAAAT GCGGTTATTG GTGTTGATGT AAGCGGAGGT GTGGAGACAA  
2341 ATGGTGTAAG AACTCTAAC AAAATAGCAA ATTTGCTCAA AAATGCTAAG AAATAGGTTA  
2401 TTAAGTAGTA GTATTTATTT AAGTATTGTT TGTGCACTTG CTGCGAGGCC TTTTAAAAAG  
2461 CAAGCATAAA AGATCTAAAC ATAAATCTG TAAATAACA AGATGTAAAG ATAATGCTAA  
2521 ATCATTGGGC TTTTGTATTG ATTGTACAGG AAAATATACA TCGCAGGGGG TTGACTTTTA  
2581 CCATTTCACC GCAATGGAAT CAACTTGTG GAAGAGAATG TTCACAGGCG CATACGCTAC  
2641 AATGACCCGA TTCTTGCTAG CCTTTTCTCG GTCTTGCAA CAACCGCCGG CAGCTTAGTA  
2701 TATAAATACA CATGTACATA CCTCTCTCCG TATCCTCGTA ATCATTTTCT TGTATTTATC  
2761 GTCTTTTCGC TGTA AAAACT TTATCACACT TATCTCAAAT AACTTATTA ACCGCTTTTA  
2820 CTATTATCTT CTACGCTGAC AGTAATATCA AACAGTGACA CATATTAAAC ACAGTGGTTT  
2881 CTTTGCAATA ACACCATCAG CCTCAAGTCG TCAAGTAAAG ATTTGCTGTT CATGCAGATA  
2941 GATAACAATC TATATGTTGA TAATTAGCGT TGCCTCATCA ATGCGAGATC CGTTTAAACG  
3001 GACCCTAGTG CACTTACCCC ACGTTCGGTC CACTGTGTGC CGAACATGCT CCTTCACTAT  
3061 TTTAACATGT GGACTAGTCT CGGGATGCAT TTTGTAGAA CAAAAAGAA GTATAGATTG  
3121 TTTGTTGGTA AAATAGCGCT CTCGCGTTGC ATTTCTGTTG TGTAAAAATG CAGCTCAGAT  
3181 TCTTTGTTTG AAAAATTAGC GCTCTCGCGT TGCATTTTGG TTTTACAAAA ATGAAGCACA  
3241 GATTCTTCGT TGGTAAAATA GCGCTTTTCG GTTGCAATTC TGTCTGTAA AAATGCAGCT  
3301 CAGATTCTTT GTTTGAAAAA TTAGCGCTCT CGCGTTGCAT TTTTGTCTA CAAAATGAAG  
3361 CACAGATGCT TCGTTAACAA AGATATGCTA TTGAAGTGCA AGATGGAAAC GCAGAAAATG  
3421 AACCGGGGAT GCGACGTGCA AGATTACCTA TGCAATAGAT GCAATAGTTT CTCAGGAAC  
3481 CGAAATACAT ACATTGTCTT CCGTAAAGCG CTAGACTATA TATTATTATA CAGGTTCAAA  
3541 TATACTATCT GTTTCAGGGA AAATCCAG GTTCGGATGT TCAAAATTCA ATGATGGGTA  
3601 ACAAGTACGA TCGTAAATCT GTAAACAGT TTGTCGGATA TTAGGCTGTA TCTCTCAAA  
3661 GCGTATTCGA ATATCATTGA GAAGCTGCAG ACTAGTTTTT CAATTCAATT CATCATTTTT  
3721 TTTTATTCTT TTTTGTGAT TTCGGTTTCT TTGAAATTTT TTTGATTCGG TAATCTCCGA  
3781 ACAGAAGGAA GAACGAAGGA AGGAGCACAG ACTTAGATTG GTATATATAC GCATATGTAG  
3841 TGTGAAGAA ACATGAAATT GCCCAGTATT CTTAACCCAA CTGCACAGAA CAAAAACCTG  
3901 CAGGAAACGA AGATAAATCA TGTGAAAGC TACATATAAG GAACGTGCTG CTACTCATCC  
3961 TAGTCTGTT GCTGCCAAGC TATTTAATAT CATGCACGAA AAGCAAACAA ACTTGTGTGC  
4021 TTCATTGGAT GTTCGTACCA CCAAGGAATT ACTGGAGTTA GTTGAAGCAT TAGGTCCCAA  
4081 AATTGTGTTA CTAAAAACAC ATGTGGATAT CTTGACTGAT TTTTCCATGG AGGGCACAGT  
4141 TAAGCCGCTA AAGGCATTAT CCGCCAAGTA CAATTTTTTA CTCTTCGAAG ACAGAAAATT  
4201 TGCTGACATT GGTAAATACAG TCAAATTGCA GTACTCTGCG GGTGTATACA GAATAGCAGA  
4261 ATGGGCAGAC ATTACGAATG CACACGGTGT GGTGGGCCCA GGTATTGTTA GCGGTTTGAA  
4321 GCAGGCGGCA GAAGAAGTAA CAAAGGAACC TAGAGGCCTT TTGATGTTAG CAGAATTGTC  
4381 ATGCAAGGGC TCCCTATCTA CTGGAGAATA TACTAAGGGT ACTGTTGACA TTGCGAAGAG  
4441 CGACAAAGAT TTTGTTATCG GCTTTATTGC TCAAAGAGAC ATGGGTGGAA GAGATGAAGG  
4501 TTACGATTGG TTGATTATGA CACCCGGTGT GGGTTTAGAT GACAAGGGAG ACGCAATTGGG  
4561 TCAACAGTAT AGAACCGTGG ATGATGTGGT CTCTACAGGA TCTGACATTA TTATTGTTGG  
4621 AAGAGGACTA TTTGCAAAGG GAAGGGATGC TAAGGTAGAG GGTGAACGTT ACAGAAAAGC  
4681 AGGCTGGGAA GCATATTGTA GAAGATGCGG CCAGCAAAAC TAAAAAATCT TATTATAAGT  
4741 AAATGCATGT ATACTAACT CACAAATTAG AGCTTCAATT TAATTATATC AGTTATTACC  
4801 CGGGAATCTC GGTGTAATG ATTTTATAA TGACGAAAAA AAAAAAATTG GAAAGAAAAA

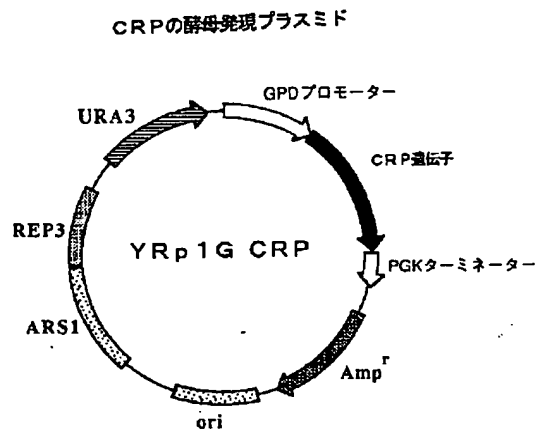
4861 GCATGCGTCG AGTTTATCAT TATCAATACT CGCCATTTC AAGAATACGT AAATAATTAA  
 4921 TAGTAGTGAT TTTCTAACT TTATTTAGTC AAAAAATTAG CCTTTTAATT CTGCTGTAAC  
 4981 CCGTACATGC CAAAATAGGG GGCGGGTTAC ACAGAAATA TAACACTGAT GGTGCTTGGG  
 5041 TGAACAGGTT TATTCCTGGC ATCCACTAAA TATAATGGAG CCGGCTTTT AAGCTGGCAT  
 5101 CCAGAAAAAA AAAGAATCCC AGCACAAAA TATTGTTTT TTCACCAACC ATCAGTTCAT  
 5161 AGGTCCATTC TCTTAGCGCA ACTACAGAGA ACAGGGCACA AACAGGCAAA AAACGGGCAC  
 5221 AACCTCAATG GAGTGATGCA ACCTGCCTGG AGTAAATGAT GACACAAGGC AATTGACCCA  
 5281 CGCATGTATC TATCTCATTT TCTTACACCT TCTATTACCT TCTGCTCTCT CTGATTGGA  
 5341 AAAAGCTGAA AAAAAAGGTT TAAACCAGTT CCCTGAAATT ATTCCCCTAC TTGACTAATA  
 5401 AGTATATAAA GACGGTAGGT ATTGATTGTA ATTCTGTAAT TCTATTTCTT AAACCTCTTA  
 5461 AATTCTACTT TTATAGTTAG TCTTTTTTTT AGTTTTAAAA CACCAAGAAC TTAGTTTCGA  
 5521 ATAAACACAC ATAAATAAAC AAAGAATTGG TCGACGGATC CCGGAGATT GAATTGAATT  
 5581 GAAATCGATA GATCAATTTT TTTCTTTTCT CTTTCCCAT CCTTTACGCT AAAATAATAG  
 5641 TTTATTTTAT TTTTGAATA TTTTATTT ATATACGTAT ATATAGACTA TTATTTACTT  
 5701 TTAATAGATT ATTAAGATT TTATTAATAA AAAATTCGTC CCTCTTTTTA ATGCCTTTTA  
 5761 TGCAGTTTTT TTTTCCATT CGATATTCT ATGTTGCGGT TTCAGCGTAT TTAAAGTTA  
 5821 ATAACGAA AATTCTGCGT TTCGAAAA

【図面の簡単な説明】

CRPの概略図を示す。

【図1】 ヒトCRPの酵母発現プラスミドYRp1G

【図1】



フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA61 BA80  
                   CA03 CA04 DA12 EA04 GA11  
                   HA15  
 4B064 AG01 AG26 AG27 CA06 CA19  
                   CC24 CE12 DA01 DA13  
 4H045 AA20 BA10 CA40 CA46 EA20  
                   EA50 FA72 FA73 FA74 HA07

**RECOMBINANT CRP AND ITS PRODUCTION**

Patent Number: JP2000014388  
Publication date: 2000-01-18  
Inventor(s): OGASAWARA YUJI;; UCHIDA KOJI  
Applicant(s): ORIENTAL YEAST CO LTD  
Requested Patent: ☐ JP2000014388  
Application Number: JP19980202894 19980703  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C12N15/09; C07K14/47; C12P21/02  
EC Classification:  
Equivalents:

---

**Abstract**

---

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new recombinant C-reactive protein(CRP) which is obtained by incorporating a gene which codes for CRP into an expression vector, introducing the obtained vector into a host, transforming the obtained host, followed by culturing the obtained host, and is useful, for example, for the diagnosis, for example, of infection, inflammation, and tissue damage, and clinical examination.

**SOLUTION:** This is a new biologically active recombinant C-reactive protein(CRP) which is obtained by incorporating a gene which codes for CRP into an expression vector, transforming a host cell by the obtained vector, followed by culturing the obtained host cell, allows preparation of CRP antibody which allows precise determination of CRP level in blood which the CRP level in blood is enhanced, for example, by infection, inflammation, and tissue damage, and which determination of the level is useful, for example, for the diagnosis and clinical examination. This recombinant CRP is obtained by amplifying/ cloning by the PCR method using human placenta chromosomal DNA as a template and using primers having a partial gene structure, followed by expressing the obtained gene which codes for CRP as described above.

---

Data supplied from the esp@cenet database - I2